

モルモット抗原吸入即時型気道反応後のプロプラノロール誘発 気管支収縮モデルにおけるアラキドン酸代謝産物および ニューロキニンの関与の検討

金沢大学医学部医学科内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

辻 浦 寧 枝 子

β 交感神経遮断薬 (β 遮断薬) 誘発気管支収縮は喘息患者に特異的現象である。機序として、コリン作働性神経以外に、ヒスタミンやトロンボキサン A_2 (thromboxane A_2 , TXA_2) などの化学伝達物質の関与が示唆されているが、いまだ完全には解明されていない。肺に存在する肥満細胞は細胞表面に β 受容体をもっており、 β 交感神経刺激薬はヒスタミンやアラキドン酸代謝産物などの化学伝達物質の放出を抑制することが知られている。また、ニューロキニンも喘息の気道炎症と迷走神経トーンスに関与している可能性がある。本研究は、 β 遮断薬誘発気管支収縮の機序を解明するため、抗原吸入即時型気道反応 (immediate airway reaction, IAR) 後のプロプラノロール誘発気管支収縮 (propranolol-induced bronchoconstriction, PIB) の動物モデルを用いて、アラキドン酸代謝産物とニューロキニンの PIB への関与を検討した。すなわち、受動感作モルモットに抗原を吸入暴露して IAR を誘発し、その 20 分後にプロプラノロールを吸入させることにより PIB を惹起させ、抗原暴露 10 分前または 15 分後に、各々の化学伝達物質の受容体拮抗薬を静脈内投与し、IAR と PIB の反応に影響を与えるかどうかを検討した。特異的スルフィドペプチド・ロイコトリエン (sulfidopeptide leukotriene, s-LT) 受容体拮抗薬である ICI 198,615 と KCA-757 は、それぞれ IAR と PIB を用量依存的に有意に抑制した。特異的血小板活性化因子 (platelet activating factor, PAF) 受容体拮抗薬である E-6123 と Y-24180 も、それぞれ IAR と PIB を用量依存的に有意に抑制した。特異的ロイコトリエン B_4 (leukotriene, LTB_4) 受容体拮抗薬の ONO-4057 は、 LTB_4 の気道内注入 1 時間後の好中球遊走を有意に抑制したが、IAR と PIB には影響を与えなかった。また、特異的 NK_1 受容体拮抗薬の FK888 と特異的 NK_2 および NK_3 受容体拮抗薬の FK224 は、いずれも IAR と PIB を変化させなかった。以上より、IAR の反応で大きな役割を担っている TXA_2 、s-LT および PAF が、PIB の発現においても重要な役割を果たしていることが示唆された。一方、サブスタンス P やニューロキニン A などのニューロキニンや LTB_4 は、IAR および PIB への関与は小さいと考えられた。

Key words leukotrienes, neurokinin, platelet activating factor, propranolol-induced bronchoconstriction, thromboxane A_2

β 交感神経遮断薬 (β 遮断薬) は、治療抵抗性で遷延し、時に致死的な気管支収縮を気管支喘息患者に引き起こすことが知られている¹⁾。しかも、ヒスタミンやアセチルコリンによる非特異的気管支収縮とは異なり、健常者に β 遮断薬を投与しても気管支収縮は起こらないことから、喘息患者に特異的な気道反応であると考えられている²⁾。

β 遮断薬であるプロプラノロールにより誘発されるプロプラノロール誘発気管支収縮 (propranolol-induced bronchoconstriction, PIB) の機序として、一つには、コリン作働性神経上の β 受容体によるアセチルコリン放出の制御が阻害され、結果として迷走神経トーンスが亢進するために生じると考えられている^{3,4)}。一方、抗コリン薬が PIB に対して有効でない症例もあり^{5,6)}、

PIB には他の因子も関与している可能性がある。ヒトの肺に存在する肥満細胞は細胞表面に β 受容体をもっており、 β 刺激薬はアナフィラキシー反応の際のヒスタミン、ロイコトリエン C_4 (leukotriene C_4 , LTC_4)、ロイコトリエン D_4 (leukotriene D_4 , LTD_4)、ロイコトリエン E_4 (leukotriene E_4 , LTE_4) などのスルフィドペプチド・ロイコトリエン (sulfidopeptide leukotriene, s-LT) やトロンボキサン A_2 (thromboxane A_2 , TXA_2) の放出を抑制することが知られている⁷⁻⁹⁾。これらの化学伝達物質は気管支喘息発作時の気管支収縮にも関与している¹⁰⁻¹³⁾ ことから、PIB の発生機序におけるこれらの化学伝達物質の関与が推定される。また、サブスタンス P (substance P, SP) やニューロキニン A (neurokinin A, NKA) などのニューロキニンも気管支収縮

平成9年4月15日受付, 平成9年5月13日受理

Abbreviations: BALF, bronchoalveolar lavage fluid; DPH, diphenhydramine hydrochloride; IAR, immediate airway reaction; LTB_4 , leukotriene B_4 ; LTC_4 , leukotriene C_4 ; LTD_4 , leukotriene D_4 ; LTE_4 , leukotriene E_4 ; NKA, neurokinin A; OA, ovalbumin; PAF, platelet activating factor; Pao, pressure at the airway opening; PIB, propranolol-induced bronchoconstriction; SP, substance P; s-LT, sulfidopeptide leukotriene; TXA_2 , thromboxane A_2 ; TXB_2 , thromboxane B_2

作用を有するが、さらに気管支喘息の慢性気道炎症にも関与している可能性が示唆されており¹⁴⁻¹⁷、PIBにも関与している可能性がある。

水橋¹⁸は、受動感作モルモットに抗原を吸入暴露して即時型気道反応 (immediate airway reaction, IAR) を惹起し、その20分後にプロプラノロールを吸入すると著明な気管支収縮が生じることを見出した。このPIB動物モデルにおいて、TXA₂の特異的受容体拮抗薬がPIBを抑制したことから、TXA₂がPIBに関与している可能性を示唆した。今回、このモルモットのPIBモデルを用いて、喘息の病態に関与していると考えられている5-リポキシゲナーゼ系アラキドン酸代謝産物のロイコトリエンB₄ (leukotriene, LTB₄) と s-LT、広い意味でアラキドン酸の関連物質であり、気管支収縮作用がある血小板活性化因子 (platelet activating factor, PAF)¹⁹、およびニューロキニンのSPと NKA について、PIB 反応への関与の有無について検討した。

対象および方法

I. 実験動物

体重350～450gのハートレー系雄性モルモット (三共ラボ、東京) を購入し、金沢大学動物実験施設内の空調飼育室 (室温23±2℃、湿度55±5%) で一週間以上飼育し、肉眼的観察により健常と判断した動物を実験に使用した。

II. モルモット抗卵白アルブミン (ovalbumin, OA) 血清の作製

Santivesら²⁰の方法に従って抗OA血清を作製した。すなわち総量500μgのOA (Sigma, St.Luis, USA) を完全フロイドアジュバント (Difco Laboratories, New York, USA) にてエマルジョンの状態にし、モルモットの両側鼠径部、両側腋窩部、項部の5箇所に分けて皮内注射した。2週間後同様の処置により追加免疫を行った。さらに2週間後採血し、血清を分離し同一容器に集めて均一化した後、小スピッツに分注して-20℃で凍結保存した。作製した抗OA血清の4時間、24時間および7日後の受動皮膚アナフィラキシー反応による抗体価は、各々12800

倍、6400倍、および512倍だった。受動感作は実験の5日前に、抗OA血清を1ml/kg腹腔内投与することにより行った。

III. 実験装置および測定項目

実験は、既報の実験装置および方法を用いて行った²¹(図1)。すなわち、ペントバルビタール (sodium pentobarbital) (Abbott Laboratories, Chicago, USA) (75mg/kg) の腹腔内投与によってモルモットを麻酔した後、仰臥位にて胸骨上縁より1横指頭側で気管切開を行って気管カニューレを装着し、小動物用従量式レスピレーター Model-1680 (Harvard Co. Inc, South Natic, USA) にて陽圧呼吸を行った。気管カニューレはポリエチレン製で外径2.5mm、内径2.1mmである。1回換気量は10ml/kg、換気回数は毎分60回とした。人工換気開始後、内因性ヒスタミンの作用を除去するため、60mg/kgのジフェンヒドラミン (diphenhydramine hydrochloride, DPH) (Sigma) を腹腔内投与した。気管支収縮反応の指標として気管カニューレの側圧 (pressure at the airway opening, Pao) を差圧トランスデューサー TP-603T (日本光電、東京) を用いて測定した。Paoは実験中はX-Yレコーダーに連続的に記録し、実験終了後1分間隔で値を読み取った。Paoは気管支収縮反応を中枢側から末梢側までの総和として反映する指標である²¹。気管支収縮反応は、抗原吸入直前のPao値を基礎値として、この基礎値に対する増加率として表した。薬物の吸入投与は、南ら²²が開発した超音波吸入器を改良した小動物用吸入負荷装置を使用し、呼吸状態を変化させることなく安静換気で30秒間吸入することにより行った。薬物の腹腔内投与は当教室で開発した腹腔内投与器を用いて確実に定量的に投与した。なお、モルモットに各種薬剤の溶液またはそれぞれの対照液としての溶媒を静脈内投与する際は、容量負荷を一定にするために1ml/kgの投与量とした。

IV. PIBモデルの作製

既報の方法を用いて次のように作成した¹⁸。実験の5日前に、抗OA血清を1ml/kg腹腔内投与して受動感作したモルモットに、60mg/kgのDPHと75mg/kgのペントバルビタールを腹腔内投与して麻酔した後、気管カニューレを装着し、陽圧呼吸を

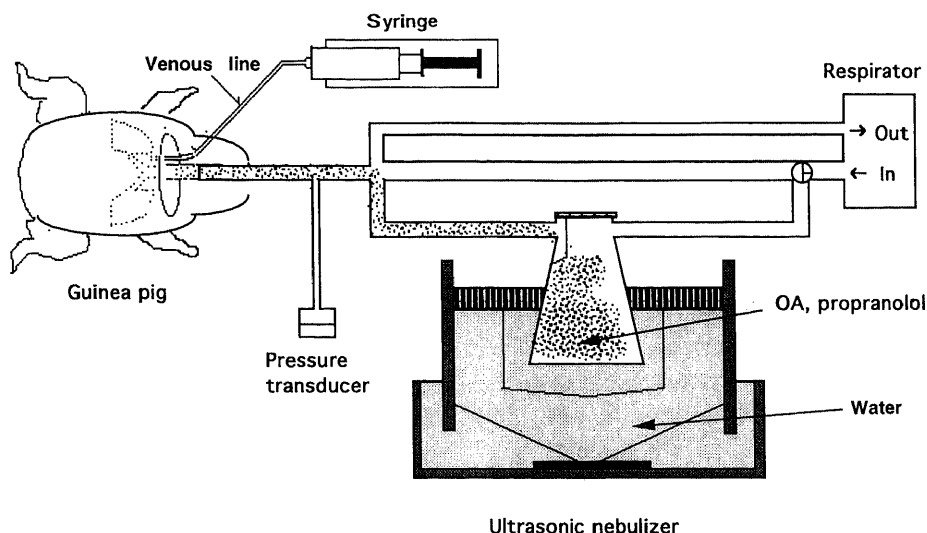


Fig. 1. Design of the experimental system.

An anesthetized guinea pig was placed in a supine position and the trachea was cannulated with polyethylene tube. The animal was artificially ventilated by a small animal respirator and nebulized with ovalbumin (OA) or propranolol. Pressure at the airway opening (Pao) was continuously recorded as an overall index of bronchial response by an X-Y recorder.

行い、Paoの安定を15分間確認してから抗原吸入暴露を行い、IARを誘発した。吸入抗原液はOAを生理食塩水に溶解して1mg/mlの濃度に調整したものを使用した。抗原吸入20分後に10mg/mlのプロプラノロール(DL-propranolol hydrochloride)(Sigma)を30秒間吸入し、PIBを惹起した。

V. 実験プロトコール

1. LTB₄受容体拮抗薬のLTB₄気道内注入による気道への白血球遊走に対する効果

特異的LTB₄受容体拮抗薬として、5-[2-(2-カルボキシエチル)-3-[6-(4-メソキシフェニル)-5E-ヘキセノキシ]オキシフェノキシ]バレリン酸(5-[2-(2-carboxyethyl)-3-[6-(4-methoxyphenyl)-5E-hexenoxy]oxyphenoxy]valeric acid, ONO-4057)(小野薬品工業, 大阪)を使用した。ONO-4057は非水溶性のため、7%炭酸水素ナトリウム溶液(sodium bicarbonate, NaHCO₃)にて懸濁して使用した。

36匹の無感作モルモットを9匹ずつ4群に分け、NaHCO₃生理食塩水群とNaHCO₃-LTB₄群にはNaHCO₃を、ONO-生理食塩水群とONO-LTB₄群には10mg/kgのONO-4057を腹腔内投与した。60分後に20mg/kgのペントバルビタールを腹腔内投与して麻酔し、気管を露出させ、23G針を使用して、NaHCO₃生理食塩水群とONO-生理食塩水群には生理的食塩水を、NaHCO₃-LTB₄群とONO-LTB₄群には50μg/ml(1.4 × 10⁻⁴ M)のLTB₄(Sigma)をそれぞれ2ml/kg気管内注入した。さらに60分後に75mg/kgのペントバルビタールの腹腔内投与により麻酔後、気管切開を行って気管カニューレを挿入し、各々2回ずつ10mlの生理的食塩水を気管内注入し、気管支肺胞洗浄液

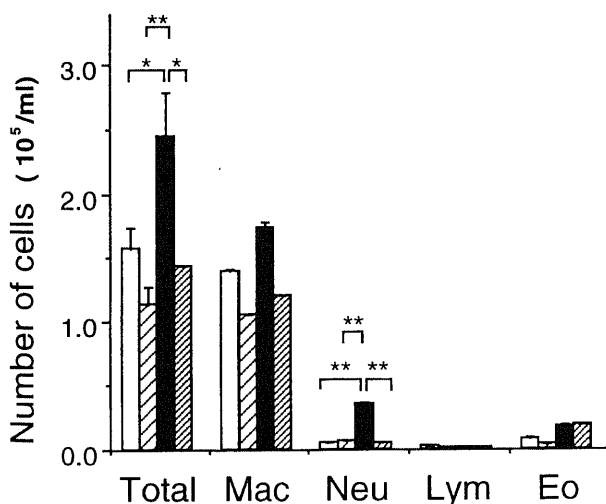


Fig. 2. Effect of ONO4057 on LTB₄-induced airway neutrophil chemotaxis. Guinea pigs were divided to 4 groups. Two groups were given intraperitoneally NaHCO₃, and other 2 groups were pretreated with ONO4057 (10 mg/kg). One hr later animals were injected intratracheally saline or LTB₄ (100 μg/kg). One hr after saline or LTB₄ instillation, total cell number and population of cells in BALF were enumerated in each group. Group: □, NaHCO₃-saline (n=9); ▨, ONO4057-saline (n=9); ■, NaHCO₃-LTB₄ (n=9); ▩, ONO4057-LTB₄ (n=9). Each bar indicates $\bar{x} \pm \text{SEM}$ of cell population. ***p<0.01, *p<0.05 compared with NaHCO₃-LTB₄ group analyzed by Mann-Whitney's U test. Total, total cell count; Mac, macrophage; Neu, neutrophil; Lym, lymphocyte; Eo, eosinophil.

(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)を得た。BALFは回収後直ちにガーゼでろ過し、800rpmで10分間遠心後、沈渣をRPMI-1640(Grand Island Biological Co., Grand Island, USA)に再浮遊させ、Büker計算板を用いて総細胞数を算出した。細胞分画はサイトスピン2(Shandon Southern Products Ltd., Cheshire, England)を用いて塗抹標本を作成し、May Giemsa染色を施して1000倍で気道上皮を除く細胞を観察して算定した。

2. LTB₄受容体拮抗薬のIARおよびPIBに対する影響

1) ONO-4057の抗原暴露前投与

10mg/kg (n=7)のONO-4057または溶媒(n=7)を抗原吸入の10分前、すなわちプロプラノロール吸入の30分前に静脈内投与した。

2) ONO-4057の抗原暴露後投与

1.0 (n=7)あるいは10mg/kg (n=7)のONO-4057または溶媒(n=7)を抗原吸入の15分後、すなわちプロプラノロール吸入の5分前に静脈内投与した。

3. s-LT受容体拮抗薬のIARおよびPIBに対する影響

特異的s-LT受容体拮抗薬として、[1-[2-メソキシ-4-[(フェニルスルフォニル)アミノ]カルボニル]メチル]-1H-インダゾル-6-イル]カルボン酸サイクロペンチルエステル([1-[2-methoxy-4-[(phenylsulfonyl) amino] carbonyl] methyl]-1H-indazol-6-yl]carbamic acid cyclopentyl ester, ICI-198,615)(Zeneca, 東京)と4-[6-アセチル-3-[3-[(4-アセチル-3-ヒドロキシ-2-プロピルフェニル)チオ]プロポキシ]-2-プロピルフェノキシ]ブタン酸(4-[6-acetyl-3-[3-[(4-acetyl-3-hydroxy-2-propylphenyl) thio] propoxy]-2-propylphenoxy]butanoic acid, KCA-757)(杏林製薬, 名古屋)を使用した。

ICI-198,615は、その1mgに対し3μlの1規定水酸化ナトリウム溶液を加えて湿らせて、ポリエチレングリコールを最終容積

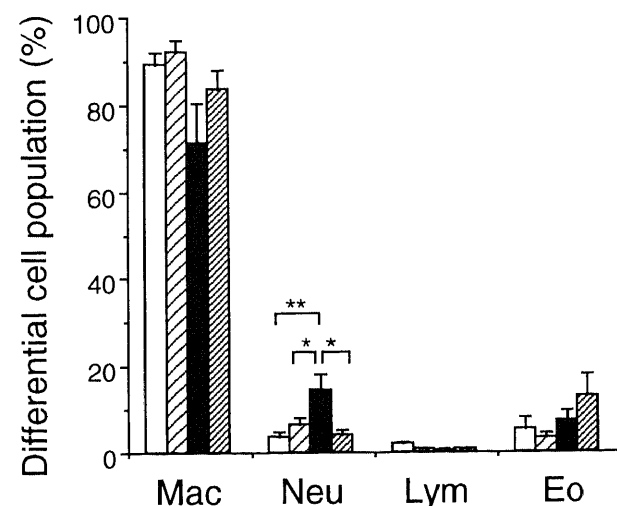


Fig. 3. Effect of ONO4057 on LTB₄-induced changes in leukocyte population in BALF. Population of cells in BALF was enumerated in each group. Group: □, NaHCO₃-saline (n=9); ▨, ONO4057-saline (n=9); ■, NaHCO₃-LTB₄ (n=9); ▩, ONO4057-LTB₄ (n=9). Each bar indicates $\bar{x} \pm \text{SEM}$ of cell population. ***p<0.01, *p<0.05 compared with NaHCO₃-LTB₄ group analyzed by Mann-Whitney's U test. Total, total cell count; Mac, macrophage; Neu, neutrophil; Lym, lymphocyte; Eo, eosinophil.

の1%加え、リン酸緩衝液 [10mMリン酸 (pH7.2), 130mM塩酸]にて目的とする濃度まで希釈して使用した。

KCA757は、その20mgに対し1mlの蒸留水を加え、1規定水酸化ナトリウム溶液を溶解するまで加え、次に希塩酸を滴下してpHを7から8に調整した後に蒸留水を加えて全量を2mlとし、10mg/mlのKCA-757溶液を作製し、最後に生理食塩水にて目的とする濃度まで希釈して使用した。

1) ICI-198,615の抗原暴露前投与

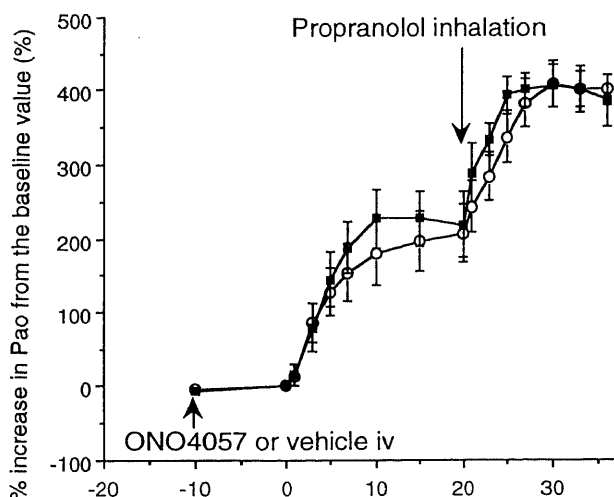


Fig. 4. Time course of percent increase in Pao from the pre-ovalbumin (OA) provocation value after inhalation of propranolol (10 mg/ml) following OA (1 mg/ml) challenge in passively sensitized guinea pigs pretreated intravenously (iv) with ONO4057 or vehicle 10 min before the OA challenge. Group: ○, pretreated with vehicle (n=7); ■, pretreated with 10 mg/kg of ONO4057 (n=7). Each point indicates $\bar{x} \pm \text{SEM}$.

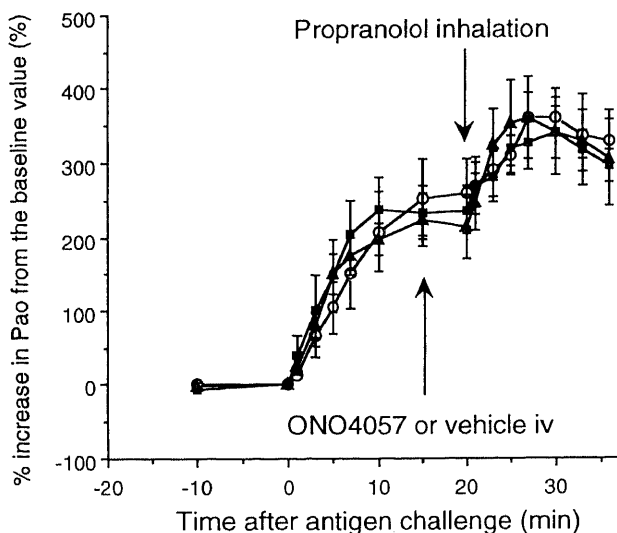


Fig. 5. Time course of percent increase in Pao from the pre-ovalbumin (OA) provocation value after inhalation of propranolol (10 mg/ml) following OA (1 mg/ml) challenge in passively sensitized guinea pigs pretreated intravenously with ONO4057 or vehicle 5 min before the propranolol inhalation. Group: ○, pretreated with vehicle (n=7); ▲, pretreated with 1 mg/kg of ONO4057 (n=7); ■, pretreated with 10 mg/kg of ONO4057 (n=7). Each point indicates $\bar{x} \pm \text{SEM}$.

0.03 (n=7)あるいは0.3mg/kg (n=7)のICI-198,615または溶媒(n=7)を抗原吸入の10分前、すなわちプロプラノロール吸入の30分前に静脈内投与した。

2) ICI-198,615の抗原暴露後投与

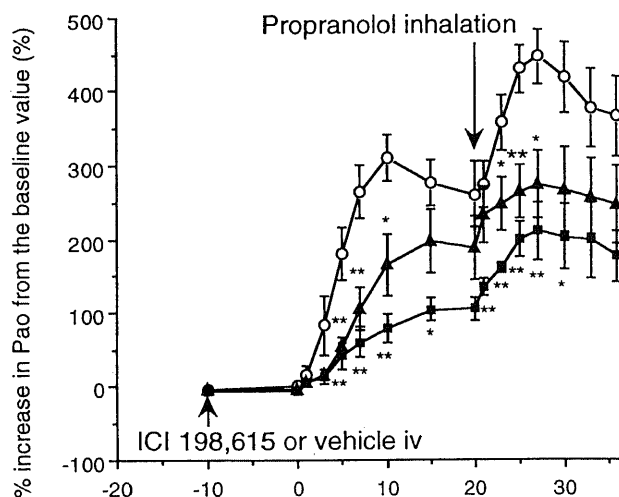


Fig. 6. Time course of percent increase in Pao from the pre-ovalbumin (OA) provocation value after inhalation of propranolol (10 mg/ml) following OA (1 mg/ml) challenge in passively sensitized guinea pigs pretreated intravenously with ICI 198,615 or vehicle 10 min before the OA challenge. Group: ○, pretreated with vehicle (n=7); ▲, pretreated with 0.03 μg/kg of ICI 198,615 (n=7); ■, pretreated with 0.3 μg/kg of ICI 198,615 (n=6). Each point indicates $\bar{x} \pm \text{SEM}$. **p<0.01, *p<0.05 compared with vehicle pretreated group analyzed by Mann-Whitney's U test.

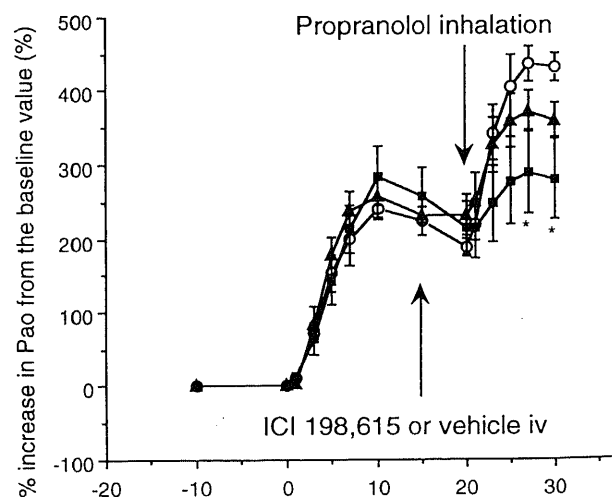


Fig. 7. Time course of percent increase in Pao from the pre-ovalbumin (OA) provocation value after inhalation of propranolol (10 mg/ml) following OA (1 mg/ml) challenge in passively sensitized guinea pigs pretreated intravenously with ICI 198,615 or vehicle 5 min before the propranolol inhalation. Group: ○, pretreated with vehicle (n=9); ▲, pretreated with 0.03 μg/kg of ICI 198,615 (n=7); ■, pretreated with 0.3 μg/kg of ICI 198,615 (n=7). Each point indicates $\bar{x} \pm \text{SEM}$. *p<0.05 compared with vehicle pretreated group analyzed by Mann-Whitney's U test.

0.03 (n=7) あるいは0.3mg/kg (n=7) のICI-198,615または溶媒 (n=7) を抗原吸入の15分後, すなわちプロプラノロール吸入の5分前に静脈内投与した。

3) KCA-757の抗原暴露前投与

生理食塩水にて溶解した1.0 (n=7) あるいは5.0mg/kg (n=7) のKCA-757または溶媒 (n=7) を抗原吸入の10分前, すなわちプロプラノロール吸入の30分前に静脈内投与した。

4) KCA-757の抗原暴露後投与

生理食塩水にて溶解した1.0 (n=7) あるいは5.0mg/kg (n=7) のKCA-757または溶媒 (n=7) を抗原吸入の15分後, すなわちプロプラノロール吸入の5分前に静脈内投与した。

4. PAF受容体拮抗薬のIARおよびPIBに対する影響

特異的PAF受容体拮抗薬として(S)-(+)-6-(2-クロロフェニル)-3-サイクロプロパンカルボニル-8, 11-ジメチル-2, 3, 4, 5-テトラヒドロ-8H-ピリド[4', 3': 4, 5]チエノ[3, 2-f][1, 2, 4]トリアゾロ[4, 3-a][1, 4]ジアゼピン ((S)-(+)-6-(2-chlorophenyl)-3-cyclopropanecarbonyl-8, 11-dimethyl-2, 3, 4, 5-tetrahydro-8H-pyrido[4', 3': 4, 5]thieno[3, 2-f][1, 2, 4]triazolo[4, 3-a][1, 4]diazepine, E-6123) (エーザイ, 東京) と4-(2-クロロフェニル)-2-(2-(4-イソブチルフェニル)エチル)-6, 9-ジメチル-6H-チエノ-(3, 2-f)(1, 2, 4)トリアゾロ-(4, 3-a)(1, 4)ジアゼピン (4-(2-chlorophenyl)-2-(2-(4-isobutylphenyl)ethyl)-6, 9-dimethyl-6H-thieno-(3, 2-f)(1, 2, 4)triazolo-(4, 3-a)(1, 4)diazepine, Y-24180) (吉富製薬, 大阪) を使用した。

1) E-6123の抗原暴露前投与

生理食塩水にて溶解した1.0 (n=5) あるいは10.0 μ g/kg (n=5) のE-6123または溶媒 (n=5) を抗原吸入の10分前, すなわちプロプラノロール吸入の30分前に静脈内投与した。

2) E-6123の抗原暴露後投与

生理食塩水にて溶解した1.0 (n=8) あるいは10.0 μ g/kg (n=8) のE-6123または溶媒 (n=8) を抗原吸入の15分後, すなわちプロプラノロール吸入の5分前に静脈内投与した。

3) Y-24180の抗原暴露前投与

生理食塩水にて溶解した1.0 (n=5) あるいは10.0mg/kg (n=5) のY-24180または溶媒 (n=5) を抗原吸入の10分前, すなわちプロプラノロール吸入の30分前に静脈内投与した。

4) Y-24180の抗原暴露後投与

生理食塩水にて溶解した1.0 (n=7) あるいは10.0mg/kg (n=7) のY-24180または溶媒 (n=6) を抗原吸入の15分後, すなわちプロプラノロール吸入の5分前に静脈内投与した。

5. ニューロキニンの関与

ニューロキニンの特異的受容体拮抗薬としてN2-[(4R)-4-ハイドロキシ-1-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)カルボニル-L-プロリ]-N-メチル-N-フェニルメチル-3-(2-ナフチル)-L-アラニナミド (N2-[(4R)-4-hydroxy-1-(1-methyl-1H-indol-3-yl) carbonyl-L-prolyl]-N-methyl-N-phenylmethyl-3-(2-naphthyl)-L-alaninamide, FK888) (藤沢薬品工業, 大阪) とN-[N2-[N-[N-[N-[2, 3-ジデヒドロ-N-メチル-N-[N-[3-(2-ペンチルフェニル)-プロピオニル]-L-スレオニル]チロジル]-L-ロイシニル]-D-フェニラニル]-L-アロ-スレオニル]-L-アスパラジニル]-L-セリン-n-ラクトン (N-[N2-[N-[N-[N-[2, 3-didehydro-N-methyl-N-[N-[3-(2-pentylphenyl)-propionyl]-L-threnonyl] tyrosyl]-L-leucynyl]-D-phenylanyl]-L-allo-threonyl]-L-asparaginy]-L-serine-n-lactone, FK224) (藤沢薬品工業) を使用した。FK888は特異的NK₁受容体拮抗薬であり, FK224は特異的NK₁およびNK₂受容体拮抗薬である。

FK888およびFK224は非水溶性のため, ジメチルスルホキシド (和光純薬工業, 大阪) に溶解して1.0と10mg/mlの溶液を調整し, 各々等量の生理的食塩水を加えて0.5と5.0mg/mlの溶液

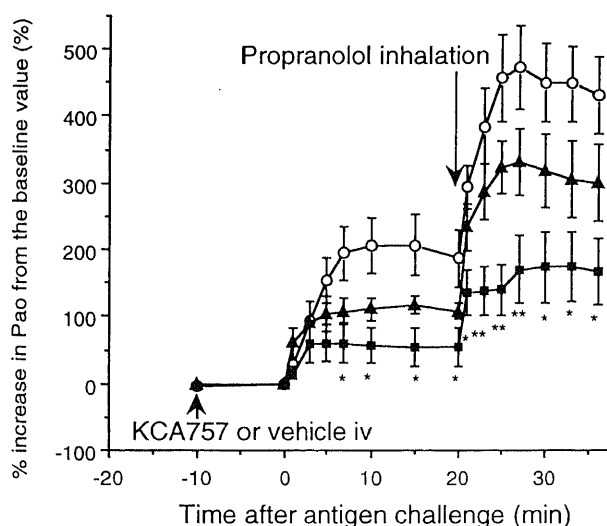


Fig. 8. Time course of percent increase in Pao from the pre-ovalbumin (OA) provocation value after inhalation of propranolol (10 mg/ml) following OA (1 mg/ml) challenge in passively sensitized guinea pigs pretreated intravenously with KCA757 or vehicle 10 min before the OA challenge. Group: ○, pretreated with vehicle (n=7); ▲, pretreated with 1 mg/kg of KCA757 (n=7); ■, pretreated with 5 mg/kg of KCA757 (n=7). Each point indicates $\bar{x} \pm$ SEM. **p<0.01, *p<0.05 compared with vehicle pretreated group analyzed by Mann-Whitney's U test.

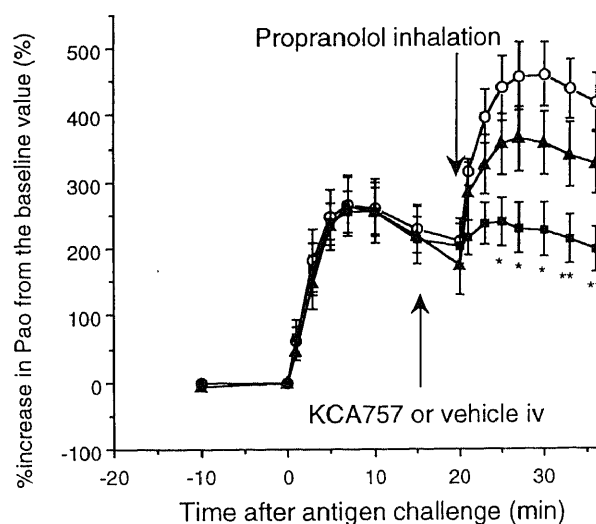


Fig. 9. Time course of percent increase in Pao from the pre-ovalbumin (OA) provocation value after inhalation of propranolol (10 mg/ml) following OA (1 mg/ml) challenge in passively sensitized guinea pigs pretreated intravenously with KCA757 or vehicle 5 min before the propranolol inhalation. Group: ○, pretreated with vehicle (n=7); ▲, pretreated with 1 mg/kg of KCA757 (n=7); ■, pretreated with 5 mg/kg of KCA757 (n=7). Each point indicates $\bar{x} \pm$ SEM. **p<0.01, *p<0.05 compared with vehicle pretreated group analyzed by Mann-Whitney's U test.

を準備した。

1) FK888の抗原暴露前投与

5mg/kg (n=7) のFK888または溶媒 (n=7) を抗原吸入の10分前、すなわちプロプラノロール吸入の30分前に静脈内投与した。

2) FK888の抗原暴露後投与

0.5 (n=7) あるいは5mg/kg (n=7) のFK888または溶媒 (n=7) を抗原吸入の15分後、すなわちプロプラノロール吸入の5分前に静脈内投与した。

3) FK224の抗原暴露前投与

5mg/kg (n=7) のFK224または溶媒 (n=7) を抗原吸入の10分前、すなわちプロプラノロール吸入の30分前に静脈内投与した。

4) FK224の抗原暴露後投与

0.5 (n=7) あるいは5mg/kg (n=7) のFK224または溶媒 (n=7) を抗原吸入の15分後、すなわちプロプラノロール吸入の5分前に静脈内投与した。

VI. 統計学的解析

成績はすべて平均値±標準誤差で表した。抗原吸入前のPaoの基礎値およびPaoの基礎値からの任意の時点の増加率またはPaoの最大増加率の差の検定には、3群以上の場合はKruskal-Wallis検定を用い、2群の場合はMann-WhitneyのU検定を用いた。各実験における抗原吸入後のPaoの基礎値からの増加率の経時変化に関する差の検定には、繰り返し測定のある分散分析 (analysis of variance, ANOVA) を用いた。両側検定で危険率5%以下を有意差ありと判定した。

成績

1. LTB₄受容体拮抗薬のLTB₄気道内注入による気道への白

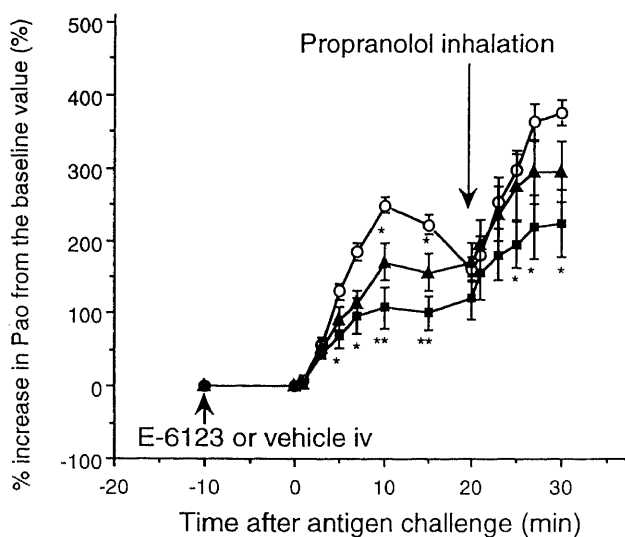


Fig. 10. Time course of percent increase in Pao from the pre-ovalbumin (OA) provocation value after inhalation of propranolol (10 mg/ml) following OA (1 mg/ml) challenge in passively sensitized guinea pigs pretreated intravenously with E-6123 or vehicle 10 min before the OA challenge. Group: ○, pretreated with vehicle (n=5); ▲, pretreated with 1 μg/kg of E-6123 (n=5); ■, pretreated with 10 μg/kg of E-6123 (n=5). Each point indicates $\bar{x} \pm \text{SEM}$. **p<0.01, *p<0.05 compared with vehicle pretreated group analyzed by Mann-Whitney's U test.

血球遊走に対する効果

NaHCO₃生理食塩水群、ONO-生理食塩水群、NaHCO₃-LTB₄群およびONO-LTB₄群におけるBALF回収量はそれぞれ、17.6±0.7, 15.4±1.1, 16.8±0.8および16.3±0.9mlで有意差を認めなかった。BALF中の総細胞数については、NaHCO₃-LTB₄群 (2.44±0.35×10⁵細胞/ml) は、NaHCO₃生理食塩水群 (1.57±0.16×10⁵細胞/ml) とONO-生理食塩水群 (1.14±0.13×10⁵細胞/ml) に比して有意に増加していた (p<0.05)。また、ONO-LTB₄群 (1.43±0.28×10⁵細胞/ml) では、NaHCO₃-LTB₄群に比して有意にBALF中の総細胞数が減少していた (p<0.05)。細胞分画については、NaHCO₃-LTB₄群において好中球数が他群に比して有意に増加していた (p<0.01) (図2)。同様に、BALF中の好中球比率においても、NaHCO₃-LTB₄群 (14.3±3.8%) は、NaHCO₃生理食塩水群 (3.5±1.5%)、ONO-生理食塩水群 (6.2±1.8%) およびONO-LTB₄群 (4.0±1.4%) に比して有意に増加していた (p<0.05) (図3)

2. LTB₄受容体拮抗薬のIARおよびPIBに対する影響

1) ONO-4057の抗原暴露前投与

抗原吸入前のPaoの値は、ONO-4057または溶媒を前処置した各群において、各々9.3±0.3, 9.6±0.4mmHgであり、2群間には有意差を認めなかった。2群のPao増加率の時間経過を図4に示した。IARとPIBは、どちらもONO-4057の前処置により変化を受けなかった。

2) ONO-4057の抗原暴露後投与

抗原吸入前のPaoの値は、1.0あるいは10 μg/kgのONO-4057または溶媒を前処置した各群において、各々10.5±0.5, 10.2±0.6, 10.0±0.5mmHgであり、3群間には有意差を認めなかった。3群のPao増加率の時間経過を図5に示した。PIBは、ONO-4057の前処置により変化を受けなかった。

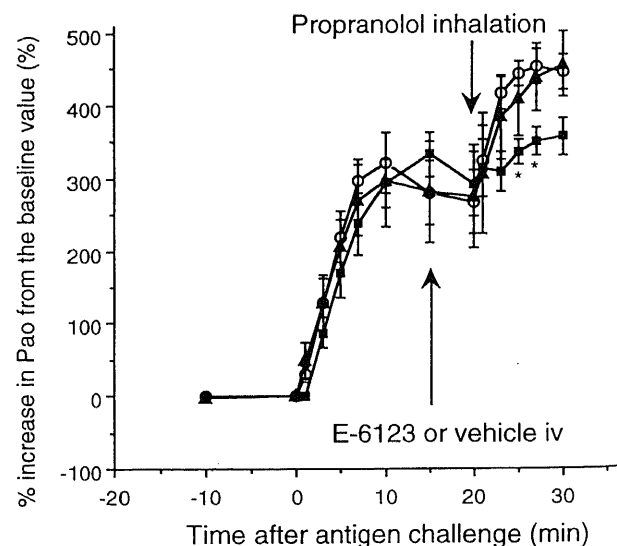


Fig. 11. Time course of percent increase in Pao from the pre-ovalbumin (OA) provocation value after inhalation of propranolol (10 mg/ml) following OA (1 mg/ml) challenge in passively sensitized guinea pigs pretreated intravenously with E-6123 or vehicle 5 min before the propranolol inhalation. Group: ○, pretreated with vehicle (n=7); ▲, pretreated with 1 μg/kg of E-6123 (n=7); ■, pretreated with 10 μg/kg of E-6123 (n=7). Each point indicates $\bar{x} \pm \text{SEM}$. *p<0.05 compared with vehicle pretreated group analyzed by Mann-Whitney's U test.

3. s-LT受容体拮抗薬のIARおよびPIBに対する影響

1) ICI-198,615の抗原暴露前投与

抗原吸入前のPaoの値は、0.03あるいは0.3mg/kgのICI-198,615または溶媒を前処置した各群において、各々 10.0 ± 0.4 , 10.4 ± 0.4 , 10.1 ± 0.5 mmH₂Oであり、3群間には有意差を認めなかった。3群のPao増加率の時間経過を図6に示した。IARとPIBは、どちらもICI-198,615の前処置により用量依存性に抑制された。抗原吸入後のPaoの最大増加率は、0.03あるいは0.3mg/kgのICI-198,615または溶媒を前処置した各群において、各々 216 ± 41 , 104 ± 16 , 331 ± 33 %であり、0.3mg/kgのICI-198,615前処置群で、溶媒群より有意にPao増加率が低値であった ($p < 0.01$)。プロプラノロール吸入後のPaoの最大増加率は、0.03あるいは0.3mg/kgのICI-198,615または溶媒を前処置した各群において、各々 287 ± 51 , 238 ± 44 , 463 ± 38 %であり、0.3mg/kgのICI-198,615前処置群で、溶媒群より有意にPao増加率は低値であった ($p < 0.01$)。

2) ICI-198,615の抗原暴露後投与

0.03あるいは0.3mg/kgのICI-198,615または溶媒を前処置した各群において、抗原吸入前のPaoの値は、各々 10.0 ± 0.0 , 10.0 ± 0.0 , 10.0 ± 0.0 mmH₂Oであり、また、抗原吸入後のPaoの最大増加率は、各々 280 ± 21 , 291 ± 37 , 262 ± 16 %であり、両者共に3群間には有意差を認めなかった。3群のPao増加率の時間経過を図7に示した。プロプラノロール吸入後のPaoの最大増加率は、0.03あるいは0.3mg/kgのICI-198,615または溶媒を前処置した各群において、各々 391 ± 24 , 300 ± 56 , 456 ± 20 %であり、0.3mg/kgのICI-198,615前処置群で、溶媒群より有意にPao増加率は低値であった ($p < 0.01$)。

3) KCA-757の抗原暴露前投与

抗原吸入前のPaoの値は、1.0あるいは5.0mg/kgのKCA-757または溶媒を前処置した各群において、各々 10.3 ± 0.4 , 10.3 ± 0.5 , 10.0 ± 0.2 mmH₂Oであり、3群間には有意差を認めなかった。3群のPao増加率の時間経過を図8に示した。IARとPIBは、どちらもKCA-757の前処置により用量依存性に抑制された。抗原吸入後のPaoの最大増加率は、1.0あるいは5.0mg/kgのKCA-757または溶媒を前処置した各群において、各々 139 ± 15 , 73 ± 30 , 279 ± 46 %であり、5.0mg/kgのKCA-757前処置群で、溶媒群より有意にPao増加率が低値であった ($p < 0.01$)。プロプラノロール吸入後のPaoの最大増加率は、1.0あるいは5.0mg/kgのKCA-757または溶媒を前処置した各群において、各々 356 ± 54 , 184 ± 53 , 494 ± 60 %であり、5.0mg/kgのKCA-757前処置群で、溶媒群より有意にPao増加率が低値であった ($p < 0.01$)。

4) KCA-757の抗原暴露後投与

1.0あるいは5.0mg/kgのKCA-757または生理食塩水を前処置した各群において、抗原吸入前のPaoの値は、各々 9.5 ± 0.4 , 9.9 ± 0.3 , 9.8 ± 0.6 mmH₂Oであり、また、抗原吸入後のPaoの最大増加率は、各々 279 ± 43 , 236 ± 48 , 269 ± 42 %であり、両者共に3群間には有意差を認めなかった。3群のPao増加率の時間経過を図9に示した。プロプラノロール吸入後のPaoの最大増加率は、1.0あるいは5.0mg/kgのKCA-757または溶媒を前処置した各群において、各々 383 ± 43 , 271 ± 38 , 474 ± 46 %であり、5.0mg/kgのKCA-757前処置群で、溶媒群より有意にPao増加率は低値であった ($p < 0.01$)。

4. PAF受容体拮抗薬のIARおよびPIBに対する影響

1) E-6123の抗原暴露前投与

抗原吸入前のPaoの値は、1.0あるいは10.0 μ g/kgのE-6123

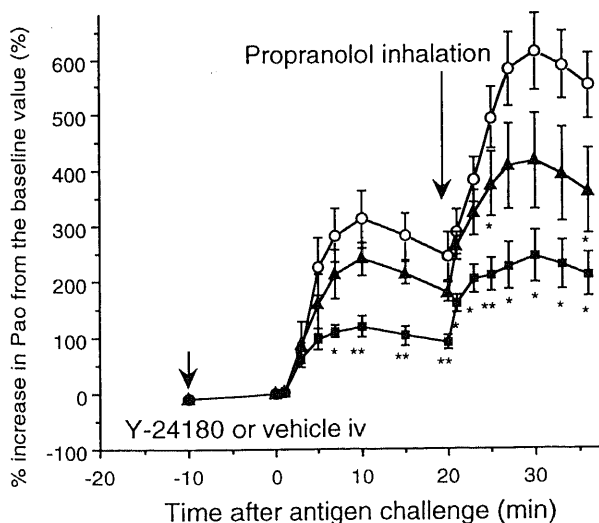


Fig. 12. Time course of percent increase in Pao from the pre-ovalbumin (OA) provocation value after inhalation of propranolol (10 mg/ml) following OA (1 mg/ml) challenge in passively sensitized guinea pigs pretreated intravenously with Y-24180 or vehicle 10 min before the OA challenge. Group: ○, pretreated with vehicle (n=5); ▲, pretreated with 1 mg/kg of Y-24180 (n=5); □, pretreated with 10 mg/kg of Y-24180 (n=5). Each point indicates $\bar{x} \pm$ SEM. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared with vehicle pretreated group analyzed by Mann-Whitney's U test.

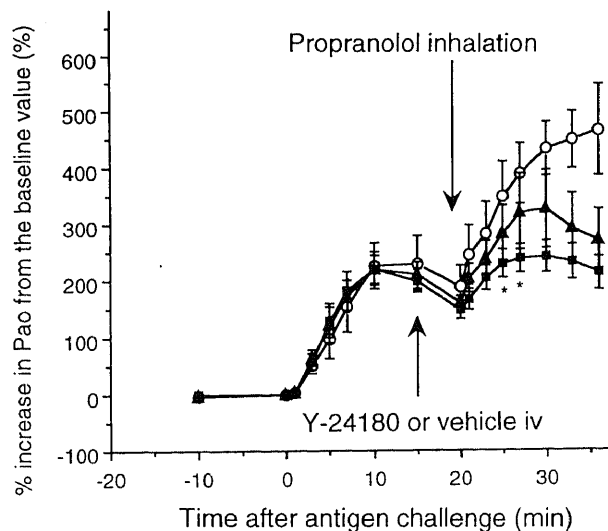


Fig. 13. Time course of percent increase in Pao from the pre-ovalbumin (OA) provocation value after inhalation of propranolol (10 mg/ml) following OA (1 mg/ml) challenge in passively sensitized guinea pigs pretreated intravenously with Y-24180 or vehicle 5 min before the propranolol inhalation. Group: ○, pretreated with vehicle (n=6); ▲, pretreated with 1 mg/kg of Y-24180 (n=6); ■, pretreated with 10 mg/kg of Y-24180 (n=6). Each point indicates $\bar{x} \pm$ SEM. * $p < 0.05$ compared with vehicle pretreated group analyzed by Mann-Whitney's U test.

または溶媒を前処置した各群において、各々 10.0 ± 0.0 , 10.0 ± 0.0 , $10.0 \pm 0.0 \text{ mmHg}$ であり、3群間には有意差を認めなかった。3群のPao増加率の時間経過を図10に示した。IARとPIBは、どちらもE-6123の前処置により濃度依存性に抑制された。抗原吸入後のPaoの最大増加率は、1.0あるいは $10.0 \mu\text{g/kg}$ のE-6123または溶媒を前処置した各群において、各々 170 ± 26 , 120 ± 56 , $256 \pm 4\%$ であり、 $10.0 \mu\text{g/kg}$ のE-6123前処置群で、溶媒群より有意にPao増加率は低値であった ($p < 0.01$)。プロプラノロール吸入後のPaoの最大増加率は、1.0あるいは $10.0 \mu\text{g/kg}$ のE-6123または溶媒を前処置した各群において、各々 294 ± 41 , 242 ± 46 , $392 \pm 16\%$ であり、 $10.0 \mu\text{g/kg}$ のE-6123前処置群で、溶媒群より有意にPao増加率は低値であった ($p < 0.05$)。

2) E-6123の抗原暴露後投与

1.0あるいは $10.0 \mu\text{g/kg}$ のE-6123または溶媒を前処置した各群において、抗原吸入前のPaoの値は、各々 10.0 ± 0.0 , 10.0 ± 0.0 , $10.0 \pm 0.0 \text{ mmHg}$ であり、また、抗原吸入後のPaoの最大増加率は、各々 330 ± 58 , 349 ± 28 , $347 \pm 41\%$ であり、両者共に3群間には有意差を認めなかった。3群のPao増加率の時間経過を図11に示した。プロプラノロール吸入後のPaoの最大増加率は、1.0あるいは $10.0 \mu\text{g/kg}$ のE-6123または溶媒を前処置した各群において、各々 457 ± 45 , 369 ± 31 , $480 \pm 29\%$ であり、 $10.0 \mu\text{g/kg}$ のE-6123前処置群で、溶媒群より有意にPao増加率は低値であった ($p < 0.05$)。

3) Y-24180の抗原暴露前投与

抗原吸入前のPaoの値は、1.0あるいは 10.0 mg/kg のY-24180または溶媒を前処置した各群において、各々 10.1 ± 0.1 , 8.9 ± 0.3 , $9.9 \pm 0.6 \text{ mmHg}$ であり、3群間には有意差を認めなかった。3群のPao増加率の時間経過を図12に示した。IARとPIBは、どちらもY-24180の前処置により用量依存性に抑制された。抗原吸入後のPaoの最大増加率は、1.0あるいは 10.0 mg/kg の

Y-24180または溶媒を前処置した各群において、各々 252 ± 28 , 121 ± 17 , $323 \pm 67\%$ であり、 5.0 mg/kg のKCA-757前処置群で、溶媒群より有意にPao増加率は低値であった ($p < 0.01$)。プロプラノロール吸入後のPaoの最大増加率は、1.0あるいは 5.0 mg/kg のKCA-757または溶媒を前処置した各群において、各々 424 ± 80 , 255 ± 41 , $611 \pm 69\%$ であり、 5.0 mg/kg のKCA-757前処置群で、溶媒群より有意にPao増加率は低値であった ($p < 0.01$)。

4) Y-24180の抗原暴露後投与

1.0あるいは 10.0 mg/kg のY-24180または溶媒を前処置した各群において、抗原吸入前のPaoの値は、各々 9.7 ± 0.2 , 9.9 ± 0.2 , $9.8 \pm 0.2 \text{ mmHg}$ であり、また、抗原吸入後のPaoの最大増加率は、各々 232 ± 23 , 243 ± 23 , $242 \pm 48\%$ であり、両者共に3群間には有意差を認めなかった。3群のPao増加率の時間経過を図13に示した。プロプラノロール吸入後のPaoの最大増加率は、1.0あるいは 10.0 mg/kg のY-24180または生理食塩水を前処置した各群において、各々 368 ± 71 , 257 ± 30 , $482 \pm 46\%$ であり、 10.0 mg/kg のY-24180前処置群で、溶媒群より有意にPao増加率は低値であった ($p < 0.05$)。

5. ニューロキニン受容体拮抗薬のIARおよびPIBに対する影響

1) FK888の抗原暴露前投与

抗原吸入前のPaoの値は、FK888または溶媒を前処置した各群において、各々 9.9 ± 0.3 , $10.1 \pm 0.2 \text{ mmHg}$ であり、2群間には有意差を認めなかった。2群のPao増加率の時間経過を図14に示した。IARとPIBは、どちらもFK888の前処置により変化を受けなかった。

2) FK888の抗原暴露後投与

抗原吸入前のPaoの値は、0.5あるいは 5.0 mg/ml のFK888または溶媒を前処置した各群において、各々 9.9 ± 0.2 , 10.4 ± 0.4 ,

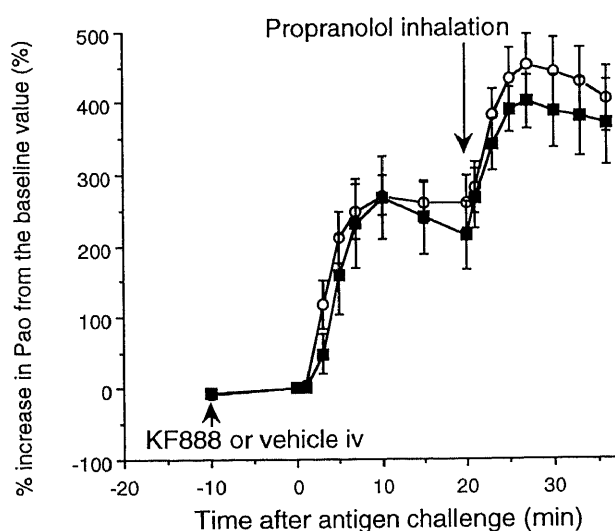


Fig. 14. Time course of percent increase in Pao from the pre-OA provocation value after inhalation of propranolol (10 mg/ml) following OA (1 mg/ml) challenge in passively sensitized guinea pigs pretreated intravenously with FK888 or vehicle 10 min before the OA challenge. Group: ○, pretreated with vehicle (n=7); ▲, pretreated with 10 mg/kg of FK888 (n=7). Each point indicates $\bar{x} \pm \text{SEM}$.

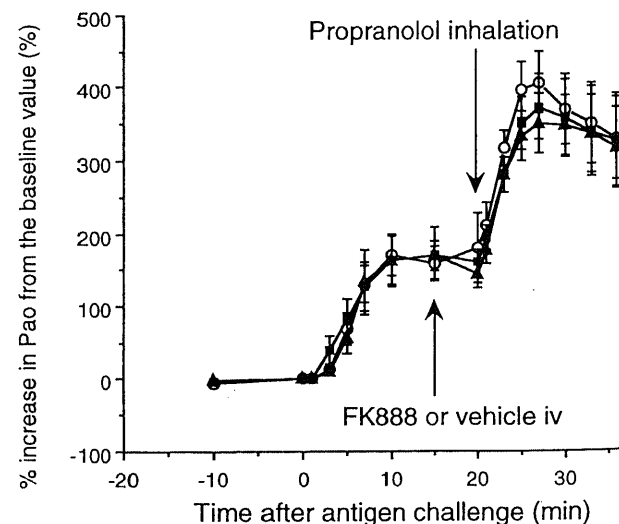


Fig. 15. Time course of percent increase in Pao from the pre-OA provocation value after inhalation of propranolol (10 mg/ml) following OA (1 mg/ml) challenge in passively sensitized guinea pigs pretreated intravenously with FK888 or vehicle 5 min before the propranolol inhalation. Group: ○, pretreated with vehicle (n=7); ▲, pretreated with 1 mg/kg of FK888 (n=7); ■, pretreated with 10 mg/kg of FK888 (n=7). Each point indicates $\bar{x} \pm \text{SEM}$.

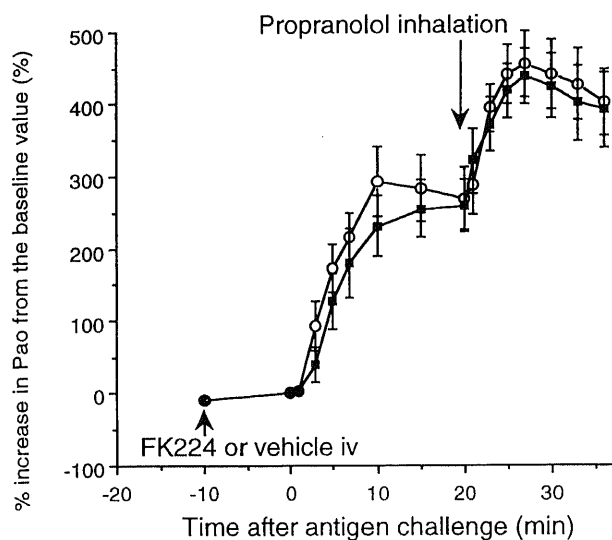


Fig. 16. Time course of percent increase in Pao from the pre-ovalbumin (OA) provocation value after inhalation of propranolol (10 mg/ml) following OA (1 mg/ml) challenge in passively sensitized guinea pigs pretreated intravenously with FK224 or vehicle 10 min before the OA challenge. Group: ○, pretreated with vehicle (n=7); ■, pretreated with 10 mg/kg of FK224 (n=7). Each point indicates $\bar{x} \pm \text{SEM}$.

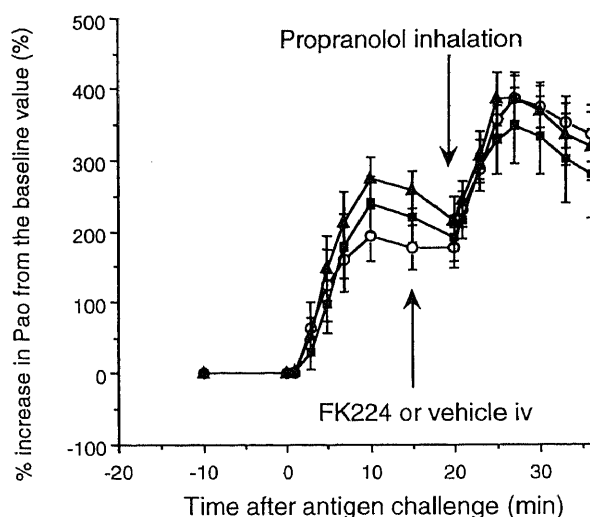


Fig. 17. Time course of percent increase in Pao from the pre-ovalbumin (OA) provocation value after inhalation of propranolol (10 mg/ml) following OA (1 mg/ml) challenge in passively sensitized guinea pigs pretreated intravenously with FK224 or vehicle 5 min before the propranolol inhalation. Group: ○, pretreated with vehicle (n=7); ▲, pretreated with 1 mg/kg of FK224 (n=7); ■, pretreated with 10 mg/kg of FK224 (n=7). Each point indicates $\bar{x} \pm \text{SEM}$.

9.4 \pm 0.2 mmH₂Oであり、3群間には有意差を認めなかった。3群のPao増加率の時間経過を図15に示した。PIBは、FK888の前処置により変化を受けなかった。

3) FK224の抗原暴露前投与

抗原吸入前のPaoの値は、FK224または溶媒を前処置した各群において、各々10.4 \pm 0.5, 10.1 \pm 0.2 mmH₂Oであり、2群間には有意差を認めなかった。2群のPao増加率の時間経過を図16に示した。IARとPIBは、どちらもFK224の前処置により変化を受けなかった。

4) FK224の抗原暴露後投与

抗原吸入前のPaoの値は、0.5あるいは5.0 mg/mlのFK224または溶媒を前処置した各群において、各々9.6 \pm 0.2, 9.6 \pm 0.2, 9.6 \pm 0.2 mmH₂Oであり、3群間には有意差を認めなかった。3群のPao増加率の時間経過を図17に示した。PIBは、FK224の前処置により変化を受けなかった。

考 察

今回の実験で、ONO-4057は、LTB₄による気道への好中球遊走をはほぼ完全に抑制したが、IARにもPIBにも影響を与えなかった。一方、ICI-198,615またはKCA-757を前処置してから抗原吸入を行うとIARとPIBは用量依存性に有意に抑制された。ICI-198,615またはKCA-757を抗原チャレンジ後に前処置してからプロプラノロールを吸入させると、PIBも用量依存性に有意に抑制された。同様に、E-6123またはY-24180を抗原暴露前に投与するとIARおよびPIBを、抗原暴露後に投与するとPIBを各々用量依存性に有意に抑制した。また、FK888またはFK224を前処置しても、IARとPIBのどちらも抑制されなかった。

PIBにおけるLTB₄の役割を調べるために使用した、選択的LTB₄受容体拮抗薬のONO-4057は、LTB₄ (10⁻⁶M) によるヒト好中球の遊走およびLTB₄ (10⁻⁷M) によるヒト好中球の脱顆粒

を抑制し (IC₅₀=0.9 \pm 0.1 \times 10⁻⁶と1.6 \pm 0.1 \times 10⁻⁶M)²³⁾、モルモットに経口投与するとLTB₄ (100 ng) による皮膚への好中球遊走を抑制する (ED₅₀=5.3 mg/kg)²³⁾。PIBにおけるs-LTの役割を調べるために2種類の選択的s-LT受容体拮抗薬、ICI-198,615とKCA-757を使用した。ICI-198,615はモルモットに静脈内投与すると用量依存性にLTC₄、LTD₄およびLTE₄による肺抵抗の増加を抑制し、用量依存性にLTC₄とLTE₄による動肺コンプライアンスの増加を抑制する²⁴⁾。KCA-757はモルモットの肺細胞膜への³H-LTD₄の結合を抑制し (IC₅₀=2.3 \times 10⁻⁶M)、モルモットに経口投与すると用量依存性にLTD₄およびLTE₄による気管支収縮を抑制する (ED₅₀=10.9および7.7 mg/kg)。PIBにおけるPAFの役割を調べるために2種類の選択的PAF受容体拮抗薬、E-6123とY-24180を使用した。E-6123はヒトおよびモルモット血小板への³H-PAFの結合を抑制し (IC₅₀=2.7と3.0 \times 10⁻⁹M)²⁵⁾、モルモットに経口投与すると用量依存性にPAFによる気管支収縮を抑制する (ED₅₀=1.3 μ g/kg)²⁶⁾。Y-24180はウサギ洗浄血小板への³H-PAFの結合を抑制し (IC₅₀=3.5 \times 10⁻⁹M)²⁷⁾、モルモットに静脈内投与すると用量依存性にPAFによる気管支収縮を抑制する (ED₅₀=12 μ g/kg)²⁶⁾。一方、PIBにおけるニューロキニンの役割を調べるために用いたFK888とFK224は、モルモットの肺細胞膜への¹²⁵I-Bolton Hunter-SPの結合を抑制する (IC₅₀=2.9 \times 10⁻⁹と1.0 \times 10⁻⁷M)²⁸⁾。FK888はモルモットに静脈内投与するとSPによる気管支収縮を抑制する (ED₅₀=0.4 mg/kg) がNK₁による気管収縮は抑制しない²⁹⁾。FK224はモルモットに静脈内投与するとSPおよびNK₁による気管支収縮を抑制する (ED₅₀=0.39と0.36 mg/kg)³⁰⁾。従って、FK888は選択的NK₁受容体拮抗作用を、FK224は選択的NK₁およびNK₂受容体拮抗作用をもつと考えられる。

以前より、PIBの機序として、コリン作動性神経上の β 受容体によるアセチルコリン放出の制御障害が関与する⁴⁰⁾と考えら

れてきた。すなわち、Indra⁴⁾は、軽症から中等症の喘息患者では、抗コリン薬である臭化オキシトロピウム (200 μ g) を前吸入すると PIB が抑制され、PIB からの回復も速やかだったと報告している。一方、Latimer⁵⁾は、臭化イプラトロピウム (160 μ g) を吸入前処置しても PIB は抑制されなかったと報告している。また、Okayama⁶⁾は、43 人の喘息患者に PIB を誘発させ、このうち 70 % はアトロピン吸入によって個人差はあるが回復し、残り 30 % ではアトロピンが無効だったと報告している。したがって、PIB の機序はコリン作働性神経のみでは説明がつかず、他の因子も関与している可能性がある。

他の機序については、Carpentiere⁷⁾が H₁ 拮抗薬であるターフェナジンが喘息患者の PIB を抑制することを示し、PIB におけるヒスタミンの関与を示唆した。ヒスタミンは肥満細胞と好塩基球に含まれている。ヒトの肺に存在する肥満細胞は細胞表面に β 受容体をもっており、 β 刺激薬はアナフィラキシー反応の際のヒスタミン、s-LT、TXA₂ の放出を抑制する¹⁰⁾¹¹⁾ことが知られている。これらの化学伝達物質は気管支喘息発作時の気管支収縮にも関与している¹⁰⁻¹³⁾ことから、PIB の発生機序においても、ヒスタミン以外の化学伝達物質が関与している可能性がある。また、ニューロキニンも喘息の気道炎症と迷走神経トーンスに関与している可能性がある。水橋¹⁴⁾は、受動感作モルモットに抗原を吸入暴露して IAR を誘発し、その 20 分後にプロプラノロールを吸入すると気管支収縮が生じる動物モデルを作製し、このモデルでは、非選択的副交感神経遮断薬のアトロピンが PIB を全く抑制しなかったことから迷走神経の関与がないタイプの PIB モデルであることを示した。また、このモデルでは、OA 吸入前に前処置した高用量の DPH により、内因性ヒスタミンの作用がほぼ完全に抑制されるため、ヒスタミンは関与していないと考えられる。水橋¹⁵⁾は、同モデルで、TXA₂ の特異的受容体拮抗薬および 5-リポキシゲナーゼ阻害薬の前処置によって PIB が抑制されたことより、PIB における TXA₂ および 5-リポキシゲナーゼ系アラキドン酸代謝産物の関与を示唆した。定量的に反応の大小が検討可能な PIB モデルは、水橋が作製したこの受動感作モルモットの PIB モデル以外に報告されていない。本研究では、この PIB 動物モデルを用いて、アラキドン酸代謝産物とニューロキニンの PIB への関与の有無を検討した。

気管支喘息の病態には数多くの化学伝達物質がかかわっているとされているが、なかでも近年アラキドン酸代謝産物の関与が注目されている。アラキドン酸からの重要な代謝経路にはシクロオキシゲナーゼ系と 5-リポキシゲナーゼ系の 2 つの代謝経路がある。気管支収縮作用をもつシクロオキシゲナーゼ系代謝産物にはプロスタグランジン F_{2 α} 、プロスタグランジン D₂、TXA₂ が知られている。中でも TXA₂ はそれ自身の強い気管支収縮作用¹²⁾¹³⁾と併せて気道過敏性の亢進作用を持ち³²⁾、近年注目を集めている。気管支収縮作用をもつ 5-リポキシゲナーゼ系のアラキドン酸代謝産物には、LTB₄、s-LT、ヒドロキシエイコサテトラエン酸などが知られているが、個々の化学伝達物質の PIB への関与については、臨床・実験ともにこれまで報告がない。LTB₄ は強力な好中球遊走作用³³⁾があり、高濃度では気道平滑筋収縮作用³⁴⁾がある。選択的 LTB₄ 受容体拮抗薬 (ONO-4057) の静脈内前投与によって IAR と PIB のどちらも抑制されなかったことより、本 PIB モデルにおいては LTB₄ の関与は少ないことが示唆された。選択的 s-LT 受容体拮抗薬 (ICI-198,615 または KCA-757) を抗原暴露前に投与すると IAR および PIB を、抗原

暴露後に投与すると PIB を各々用量依存的に抑制したことより、PIB への s-LT の関与が示唆された。また、PAF はその前駆物質がアラキドン酸と同一物質であることより、広い意味でアラキドン酸の関連物質の一つであるが、気管支収縮作用をもつ¹⁶⁾、選択的 PAF 受容体拮抗薬 (E-6123 または Y-24180) を抗原暴露前に投与すると IAR および PIB を、抗原暴露後に投与すると PIB を各々用量依存的に抑制したことより、PIB への PAF の関与が示唆された。s-LT と PAF は、各々、2 つの異なる阻害薬を用いて同様の影響が確認されたことから、それぞれの薬物に特異的な未知の薬理作用ではなく、両薬剤に共通の s-LT または PAF 受容体拮抗作用が PIB を抑制したと考えられる。一方、TXA₂、s-LT および PAF には相互作用のあることが報告されている。斉藤³⁵⁾はモルモットの気道で、LTC₄ と PAF は一部 TXA₂ の産生を介して気管支収縮を生じるが、逆に TXA₂ は LTC₄ と PAF の産生を刺激しないことを示した。Smith³⁶⁾は健康者に LTD₄ を吸入させ、24 時間後に回収した BALF 中のマクロファージではトロンボキサン B₂ (thromboxane B₂, TXB₂) 産生能が亢進していたと報告している。TXB₂ は TXA₂ の安定代謝産物である。また、Taylor³⁷⁾は喘息患者に PAF を吸入させて気管支収縮を誘発した後、尿中の TXB₂ と s-LT の最終代謝産物である LTE₄ 濃度が上昇したと報告している。これらのことから、本 PIB モデルにおいても、s-LT は、一部 TXA₂ の産生を介して PIB を誘発している可能性がある。さらに、PAF も同様に、TXA₂ の産生を介して PIB を誘発している可能性がある。

SP には気管支収縮作用・気管支血管透過性亢進作用・気道粘液分泌亢進作用などがあり、NK₁ 受容体を介して作用する¹⁴⁻¹⁷⁾。NKA も気道の C 線維に同定されており、また SP より強力な気管支収縮作用を有することより、気管支平滑筋には NK₂ 受容体が存在すると考えられている¹⁴⁻¹⁶⁾。今回の実験で用いた NK₁ 受容体拮抗薬 (FK888) あるいは NK₁ および NK₂ 受容体拮抗薬 (FK224) の静脈内前投与によって IAR と PIB のどちらも抑制されなかったことより、本 PIB モデルにおいては SP や NKA などのニューロキニンの関与は小さいことが示唆された。また、水口¹⁸⁾は、OA 受動感作モルモットにおいて FK888 または FK224 は、IAR には関与しないが IAR 後の気道過敏性亢進に関与すると報告していることから、PIB は単なる IAR 後の気道過敏性亢進によって誘発されたものではないことが示唆された。

以前からの迷走神経、ヒスタミンおよび TXA₂ の報告に加えて、今回の受動感作モルモット PIB モデルの検討によって、s-LT と PAF もまた PIB に関与している可能性が示唆された。さらに、s-LT と PAF は、一部、TXA₂ を介して PIB を惹起している可能性がある。また、LTB₄ およびニューロキニンは、PIB への関与は少ないと考えられた。本モデルの PIB 誘発の機序として、IAR のアナフィラキシー反応により放出された TXA₂ や s-LT などの化学伝達物質による気管支収縮反応がプロプラノロールにより増強されて PIB を惹起したと考えられ、単なる IAR 後の気道過敏性亢進によるものではないと考えられた。Kirchner³⁸⁾は、モルモットにおいて、プロプラノロールを静注前処置、または両側副腎を摘出すると、LTD₄ を吸入させたときに生じる気管支収縮反応が亢進したと報告している。このメカニズムが、外因性の LTD₄ の気管支平滑筋への直接作用の増強によるものか、外因性の LTD₄ が内因性の他の化学伝達物質を放出させることにより二次的に生じるのかは不明であるが興味深い。喘息患者における PIB の反応においても、 β 受容体

による化学伝達物質の制御が β 遮断薬によって解除されること
によって、慢性気道炎症に由来する化学伝達物質の産生と放出
が亢進し、これら化学伝達物質の相互作用によって治療抵抗性
の気管支収縮が誘発されている可能性がある。

結 論

1. LTB_4 受容体拮抗薬 (ONO-4057) の静脈内前投与によって
IAR と PIB のどちらも抑制されなかったことより、本 PIB モデ
ルにおいては LTB_4 の関与は少ないことが示唆された。

2. s-LT受容体拮抗薬 (ICI-198,615 または KCA-757) を抗原
暴露前に投与すると IAR および PIB を、抗原暴露後に投与する
と PIB を各々用量依存的に抑制した。

3. PAF 受容体拮抗薬 (E-6123 または Y-24180) を抗原暴露前
に投与すると IAR および PIB を、抗原暴露後に投与すると PIB
を各々用量依存的に抑制した。

4. NK_1 受容体拮抗薬 (FK888) あるいは NK_1 および NK_2 受容
体拮抗薬 (FK224) の静脈内前投与によって IAR と PIB のどちら
も抑制されなかったことより、本 PIB モデルにおいては SP や
NKA などのニューロキニンの関与は小さいことが示唆された。

PIB の発生機序にはコリン作動性神経や TXA_2 以外に、s-LT や
PAF などの化学伝達物質が重要な役割を果たしていることが示
唆された。しかし、 LTB_4 やニューロキニンの関与は否定的と
考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会と御校閲を賜った松田 保教授
ならびに、御指導・御校閲をいただきました藤村政樹講師に深甚なる謝
意を表します。同時に御指導・御協力をいただきました当教室呼吸器グ
ループの諸先生方に深く感謝の意を表します。本研究で試薬として使用
した ONO-4057, ICI 198,615, KCA-757, E-6123, Y-24180, FK888,
FK224 は、それぞれ小野薬品工業、杏林製薬、エーザイ、吉富製薬、藤
沢薬品工業から提供頂き、各位に感謝いたします。

文 献

- 1) Foresi A, Chetta A, Corbo GM, Cuomo A, Olivieri D. Provocative dose and dose-response curve to inhaled propranolol in asthmatic patients with bronchial hyperresponsiveness to methacholine. *Chest* 92: 455-459, 1987
- 2) Zaid G, Beal GN. Bronchial response to beta-adrenergic blockade. *N Engl J Med* 275: 580-584, 1966
- 3) Okayama M, Shen T, Midorikawa J, Lin J, Inoue H, Takishima T, Shirato K. Effect of pilocarpine on propranolol-induced bronchoconstriction in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 76-80, 1994
- 4) Ind PW, Dixon CM, Fuller R, Barnes PJ. Anticholinergic blockade of beta-blocker-induced bronchoconstriction. *Am Rev Respir Dis* 139: 1390-1394, 1989
- 5) Latimer KM, Ruffin RE. The effect of inhaled fenoterol and ipratropium bromide on propranolol induced bronchoconstriction in the asthmatic airways. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 17: 627-635, 1990
- 6) Okayama M, Yafuso N, Nogami H, Lin YN, Horio S, Hida W, Inoue H, Takishima T. A new method of inhalation challenge with propranolol. *J Allergy Clin Immunol* 80: 291-299, 1987
- 7) Terpstra GK, Raaijmakers JAK, Wassink GA. Propranolol induced bronhoconstriction: A non specific side effect of beta-

adrenergic blocking therapy. *Eur J Pharmacol* 73: 107-108, 1981

- 8) Howarth PH, Durham SR, Lee TH, Kay AB, Church MK, Holgate ST. Influence of albuterol, cromolyn sodium and ipratropium bromide on the airway and circulating mediator responses to antigen provocation in asthma. *Am Rev Respir Dis* 132: 986-992, 1985
- 9) Fujimura M, Sakamoto S, Nishi K, Saito M, Miyake Y, Matsuda T. Inhibitory effect of inhaled procaterol on anaphylactic bronchoconstriction and thromboxane production in guinea pigs. *Clin Exp Allergy* 21: 189-194, 1991
- 10) White MV, Slater JE, Kaliner MA. Histamine and asthma. *Am Rev. Respir Dis* 135: 1165-1176, 1987
- 11) Lewis RA, Austen KF, Soberman RJ. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. *N Engl J Med* 323: 645-654, 1990
- 12) Barnes PJ, Chung KF, Page CP. Inflammatory mediators and asthma. *Prmacol Rev* 40: 49-84, 1988
- 13) Svensson J, Strandberg K, Tuvemo T, Hamberg M. Thromboxane A_2 : Effect on airway and vascular smooth muscle. *Prostaglandins* 14: 425-436, 1977
- 14) Tomaki M, Ichinose M, Miura M, Hirayama Y, Yamauchi H, Nakajima N, Shirato K. Elevated substance P content in induced sputum from patients with asthma and patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 151: 613-617, 1995
- 15) Joos GF, Kips JC, Pauwels RA. In vivo characterization in the tachykinin receptors involved in the direct and indirect bronchoconstrictor effect of tachykinins in two inbred rat strains. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 1160-1166, 1994
- 16) Mizuguchi M, Fujimura M, Amemiya T, Nishi K, Ohka T, Matsuda T. Involvement of NK_2 receptors rather than NK_1 receptors in bronchial hyperresponsiveness induced by allergic reaction in guinea-pigs. *Br J Phamacol* 117: 443-448, 1996
- 17) Joos GF, Pauwels RA. The in vivo effect of tachykinins on airway mast cells of the rat. *Am Rev Respir Dis* 148: 922-926, 1993
- 18) 水橋啓一. モルモット抗原吸入即時型気管支収縮反応後のプロプラノロール誘発気管支収縮モデルの作製とトロンボキサン A_2 および5-リポキシゲナーゼ代謝産物の関与. *十全医会誌*. 103: 530-540, 1994
- 19) Taylor IK, Ward PS, Taylor GW, Dollery CT, Fuller, R. W. Inhaled PAF stimulates leukotoriene and thrombozane A_2 production in humans. *J Appl Physiol* 71: 1396-1402, 1991
- 20) Santives T, Roska A, Hensley GT, Moore VL, Fink JN, Abromoff P. Immunologically induced lung disease in guinea pig. *J Allergy Clin Immunol* 57: 582-594, 1976
- 21) 藤村政樹. In vivo モルモットにおける slow-reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) による気道反応とステロイドの抑制作用. *アレルギー* 32: 365-375, 1983
- 22) 南 真司, 岡藤和博, 佐賀 努, 藤村政樹, 金森一紀, 宮保進, 服部純一, 川井 清. モルモットにおける定量的吸入装置の開発. *日胸疾患会誌* 2: 252-258, 1983
- 23) Kishikawa K, Tateishi N, Seo R, Tada M, Miyamoto T. ONO-4057, a novel, orally active leukotriene B_4 antagonist: effects on LTB_4 -induced neutrophil functions. *Prostaglandins* 44: 261-275, 1992

- 24) Krell RD, Jiles RE, Yee YK, Snyder DW. In vitro pharmacology of ICI 198,615: A novel, potent and selective peptide leukotriene antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 243: 557-564, 1987
- 25) Tsunoda H, Sakuma Y, Harada K, Muramoto K, Katayama S, Horie T, Shimomura N, Clark R, Miyazawa S, Okano K. Pharmacological activities of novel thienodiazepine derivative as a platelet-activating factor antagonist. *Arzneim Forsch (Drug Res)* 143: 791-82, 1990
- 26) Sakuma Y, Tsunoda H, Shirato M, Takayama S, Yamatsu S, Katayama K. Pharmacological effects of oral E6123, a novel PAF antagonist, on biological changes induced by PAF inhalation in guinea-pigs. *Prostaglandins* 42: 463-472, 1991
- 27) Takehara S, Mikashima H, Muramoto Y, Terasawa M, Setoguchi M, Tahara T. Pharmacological actions of Y-24180, a new specific antagonist of platelet-activating factor (PAF): II. Interactions with PAF and benzodiazepine receptors. *Prostaglandins* 40: 571-583, 1990
- 28) Walsh DA, Salmon M, Featherstone R, Wharton J, Church MK, Polak JM. Differences in the distribution and characteristics of tachykinin NK₁ binding sites between human and guinea pig lung. *Br J Pharmacol* 113: 1407-1415, 1994
- 29) Murai M, Maeda Y, Hagiwara D, Miyake H, Ikari N, Matsuo M, Fujii T. Effects of an NK₁ receptor antagonist, FK888, on constriction and plasma extravasation induced in guinea pig airway by neurokinins and capsaicin. *Eur J Pharmacol* 236: 7-13, 1993
- 30) Murai M, Morimoto H, Maeda Y, Kiyotoh S, Nishikawa M, Fujii T. Effect of FK224, a novel compound NK₁ and NK₂ receptor antagonist, on airway constriction and airway edema induced by neurokinins and sensory nerve stimulation in guinea pigs. *J Pharmacol Exp Ther* 262: 403-408, 1992
- 31) Carpentiere G, Castello F, Marino S. Effect of oral terfenadine on the bronchoconstrictor response to inhaled propranolol and histamine in asthmatics. *Curr Ther Res Clin Exp* 49: 503-507, 1991
- 32) Jongejan RC, De Jongste JC, Raatgeep RC, Stijnen T, Bonta IL, Kerrebijn KF. Effect of inflammatory mediators on the responsiveness of isolated human airways to methacholine. *Am Rev Respir Dis* 142: 1129-1132, 1990
- 33) Richards IM, Griffin LR, Oostveen JA, Morris J, Wishka DG, Dunn CJ. Effect of selective leukotriene B₄ antagonist U-75302 on antigen-induced bronchopulmonary eosinophilia in sensitized guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 140: 1712-1916, 1989
- 34) Andazola JJ, Underwood JA, Chiono M, Torres OA, Herman CA. Leukotriene B₄ and B₅ have binding sites on lung membranes and cause contraction of bullfrog lung. *J Pharmacol Exp Ther* 263: 1111-1117, 1992
- 35) 齊藤元泰. モルモット即時型喘息反応におけるトロンボキサンA₂, ロイコトリエンおよび血小板活性化因子の関与と相互作用, 十全医会誌 101: 730-739, 1992
- 36) Smith LJ, Shamsuddin M, Houston M. Effect of leukotriene D₄ and platelet-activating factor on human alveolar macrophage eicosanoid and PAF synthesis. *Am Rev Respir Dis* 148: 682-688, 1993
- 37) Kirchner T, Weichman BM. Propranolol potentiates leukotriene D₄-induced bronchoconstriction and enhances antagonism by FPL 55712. *Prostaglandins* 27: 119-129, 1984

The Role of Arachidonate Acid Metabolites and Neurokinins in Propranolol-induced Bronchoconstriction after Allergic Immediate Airway Reaction in Guinea Pigs Mieko Tsujiura, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — *J. Jusen Med Soc.*, 106, 327 — 338 (1997)

Key words propranolol-induced bronchoconstriction, thromboxane A₂, leukotrienes, platelet activating factor, neurokinin

Abstract

Beta-blockers cause prolonged and severe bronchoconstriction in asthmatics but not in normal subjects. The exact mechanism of propranolol-induced bronchoconstriction (PIB) is unclear, though the participation of cholinergic nerve innervation and histamine has been proposed. It is known that pulmonary mast cells have beta-adrenoreceptors on the surface, and that beta₂-adrenoreceptor agonists stabilize mast cells and inhibit the release of histamine and other chemical mediators including arachidonate acid metabolites. On the other hand, neurokinins may also play an important role in the airway inflammation and the increased vagal tone in asthma. The present study was designed to determine the role of arachidonate acid metabolites and neurokinins in our guinea pig PIB model where thromboxane A₂ (TXA₂) is involved. When inhaled 20 minutes after antigen challenge, propranolol (10 mg/kg) caused bronchoconstriction in passively sensitized and artificially ventilated guinea pigs. Pretreatment of the animals with intravenous administration of two selective sulfidopeptide leukotriene antagonists, ICI 198,615 and KCA-757, and two selective platelet activating factor (PAF) antagonists, E-6123 and Y-24180, reduced the PIB significantly in a dose dependent manner. A selective leukotriene B₄ (LTB₄) antagonist, ONO-4057, inhibited LTB₄-induced airway neutrophil accumulation, but did not reduce the PIB. A selective NK₁ antagonist, FK888, or a selective NK₁ and NK₂ receptor antagonist, FK224, had no effect on the PIB. These results suggest that sulfidopeptide leukotrienes and PAF may play more important parts than LTB₄, substance P or neurokinin A in the pathophysiology of the PIB.